

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Hayati Program Studi Kimia, FPMIPA UPI. Sedangkan, uji aktivitas enzim menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI. Waktu pelaksanaan penelitian dimulai pada bulan Februari sampai Agustus 2023.

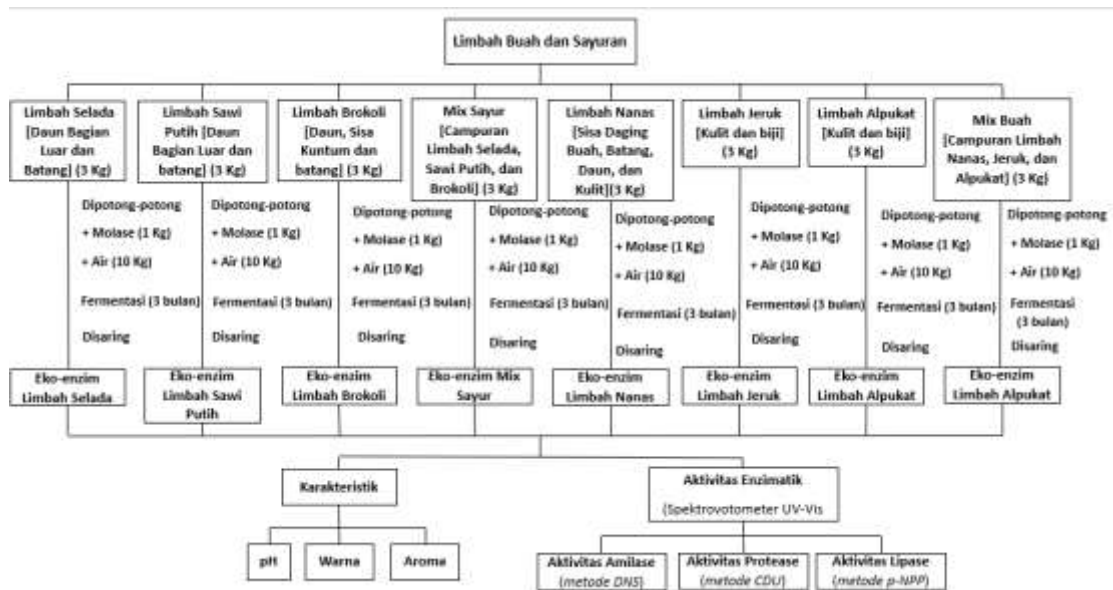
3.2 Alat dan Bahan

Proses produksi, karakterisasi, dan uji aktivitas eko-enzim menggunakan bahan-bahan meliputi air, molase, limbah buah (nanas, alpukat, dan jeruk), dan limbah sayuran (selada, sawi putih, dan brokoli), pati, asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) (Himedia, India), Natrium-K-Tartrat (Merck, Jerman), NaOH (Merck, Jerman), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , Folin-Ciocalteu (Himedia, India), kasein, isopropanol, *p-nitrophenyl palmitate* (p-NPP) (Merck, Jerman), gum arab, triton X100 (Himedia, India).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *hotplate*, *magnetic stirrer*, pH meter, *vortex*, peralatan gelas, termometer, dan spektrofotometri UV-Vis (UV mini 1240, Shimadzu).

3.3 Alur Prosedur Penelitian

Penelitian terdiri dari tiga proses utama yaitu proses produksi eko-enzim, karakterisasi, dan uji aktivitas enzimatik. Alur prosedur penelitian ditunjukkan pada **Gambar 3.1**.



Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian Karakterisasi dan Uji Aktivitas Eko-enzim Limbah Buah dan Sayuran

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Produksi Eko-enzim Limbah Buah dan Sayuran

Pada penelitian ini dilakukan 8 variasi eko-enzim yang berasal dari limbah selada berupa batang dan daun, limbah sawi putih berupa daun bagian luar dan bonggol, limbah brokoli berupa daun dan batang, *mix* sayur (campuran limbah selada, sawi putih, dan brokoli), limbah nanas berupa sisa daging, kulit, batang, dan daun, limbah alpukat berupa biji dan kulit, limbah jeruk berupa biji dan kulit, dan *mix* buah (campuran limbah nanas, alpukat, dan jeruk). Limbah buah dan sayur dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil sebanyak 3 Kg dan dimasukkan ke dalam ember. Ditambahkan ke dalamnya molase 1 Kg dan air 10 Kg lalu diaduk hingga tercampur. Eko-enzim ditutup rapat dan disimpan di ruangan yang tidak terkena cahaya matahari. Pada satu bulan pertama tutup ember dibuka dan tutup setiap hari.

3.4.2 Karakterisasi Eko-enzim Limbah Buah dan Sayuran

Karakterisasi eko-enzim meliputi uji pH, warna, dan aroma. Uji pH eko-enzim menggunakan alat pH indikator dan pH meter. Warna dan aroma eko-enzim diamati secara organoleptik.

3.4.3 Uji Aktivitas Enzimatik Eko-enzim Limbah Buah dan Sayuran

3.4.3.1 Uji Aktivitas Amilase

Sebanyak 0,5 mL larutan eko-enzim yang telah disentrifugasi pada 10.000 rpm ditambahkan 0,5 mL pati 1% kemudian, diinkubasi pada suhu 25 °C selama 10 menit. Ditambahkan 1 mL pereaksi DNS dan diinkubasi dalam penangas air mendidih selama 5 menit. Didinginkan hingga suhu kamar dan ditambahkan aquades sebanyak 8 mL. Absorbansi campuran dibaca pada 540 nm (Arun, C. dan Sivashanmugam, P., 2015).

$$\text{Aktivitas Amilase} = \frac{\text{glukosa (mg)} \times \text{fp}}{\text{Mr glukosa} \times t \times V}$$

3.4.3.2 Uji Aktivitas Protease

1 mL larutan kasein 1% dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL eko-enzim yang telah disentrifugasi pada 10.000 rpm. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan dibiarkan bereaksi selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 5 ml asam trikloroasetat (TCA) 5%. Tabung reaksi disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. 1 mL supernatan yang diperoleh setelah sentrifugasi diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi terpisah dan ditambahkan 5,5 mL larutan (50 bagian Na₂CO₃ 2% dalam 0,1 N NaOH dan 1 bagian 0,5% CuSO₄). Kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen Folin–Ciocalteu, dicampur dan didiamkan selama 30 menit. Diukur pada panjang gelombang 660 nm (Arun, C. dan Sivashanmugam, P., 2015).

$$\text{Aktivitas Protease} = \frac{\text{tirosin (mg)} \times \text{fp}}{\text{Mr tirosin} \times t \times V}$$

3.4.3.3 Uji Aktivitas Lipase

Campuran reaksi mengandung 0,5 mL larutan eko-enzim yang telah disentrifugasi pada 10.000 rpm dan 9,5 mL larutan substrat (1 bagian 3,0 mM p-NPP dalam 2 propanol dengan 9 bagian 0,4% Triton X100 dan 0,1% arabic gum). Campuran reaksi diinkubasi pada 37 °C selama 20 menit dan absorbansi campuran dibaca pada 410 nm (Arun, C. dan Sivashanmugam, P., 2015).

$$\text{Aktivitas Lipase} = \frac{p\text{-nitrophenol (mg)} \times fp}{Mr p\text{-nitrophenol} \times t \times V}$$